

# 桂枝茯苓丸抑制大鼠子宫内膜异位症血管生成的作用及机制

万贵平<sup>1\*</sup>, 张真真<sup>1</sup>, 汤伟伟<sup>1</sup>, 桂涛<sup>1</sup>, 朱利<sup>1</sup>, 马小平<sup>1</sup>, 钱如云<sup>1</sup>, 胡春萍<sup>2</sup>, 曹鹏<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 妇科肿瘤研究室, 南京 210028;  
2. 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室, 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 探讨桂枝茯苓丸抑制大鼠子宫内膜异位症血管生成的作用及机制。方法: 采用自体移植法建立大鼠子宫内膜异位症模型, 分为模型对照组(阴性对照)、桂枝茯苓丸低、高剂量组(4.13, 8.26 g·kg<sup>-1</sup>)、孕三烯酮组(阳性对照, 0.23 g·kg<sup>-1</sup>)。另设假手术对照组。连续给药28 d后处死大鼠, 免疫组化法检测异位内膜中的增殖细胞核抗原(PCNA)和血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的表达, 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测腹腔液中血管内皮生长因子(VEGF)的水平, RT-qPCR检测异位内膜中VEGF和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的表达。结果: 桂枝茯苓丸显著抑制异位内膜中PCNA, CD31的表达, 降低腹腔液中VEGF的水平( $P < 0.05$ )以及异位病灶中VEGF、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的mRNA表达水平( $P < 0.01$ )。结论: 桂枝茯苓丸显著抑制大鼠子宫内膜异位症的血管生成作用, 其作用机制与抑制VEGF和HIF-1 $\alpha$ 的表达有关。

**[关键词]** 桂枝茯苓丸; 子宫内膜异位症; 血管生成; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0161-05

**[doi]** 10.11653/syfy2014010161

**[收稿日期]** 20130530(005)

**[基金项目]** 江苏省中医药局科技项目(LZ11057); 江苏省高校优势学科建设工程一期项目(YS2012ZYX315); 江苏省中医药研究院引进人才科研启动基金(RC1107)

**[通讯作者]** \* 万贵平, 医学硕士, 副教授, 从事子宫内膜异位症的中西医结合治疗研究, Tel: 025-85638716, E-mail: wanguiping@263.net  
\* 曹鹏, 博士, 研究员, 从事分子药理研究, Tel: 025-85608666, E-mail: pciao79@yahoo.com

## [参考文献]

- [1] 李仪奎, 王钦茂. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 298, 304, 350.
- [2] 李卫星, 谭大琦, 李秋华, 等. 消瘀止痛膏治疗大鼠软组织损伤的实验研究[J]. 中医正骨, 2000, 12(11): 11.
- [3] 冉得洲, 蓝肇熙. 郑怀贤医著集粹[M]. 成都: 四川大学出版社, 1997: 145.
- [4] 滕忠, 李茂, 周军, 等. 济民风湿王抗炎、镇痛和对急性软组织损伤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 176.
- [5] 章建华, 尹华, 刘云飞, 等. 三黄散瘀巴布剂对急性软组织损伤大鼠的治疗作用[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(1): 219.
- [6] 董静, 叶锐彬, 温呈洪. 郑氏伤科活络膏对急性软组织损伤动物模型抗炎机制的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(11): 200.
- [7] 匡建军, 张信成, 罗星华, 等. 肿痛消巴布膏对炎性渗出液中PGE<sub>2</sub>, IL-6含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 236.
- [8] Pawel Kalinski. Regulation of immune responses by prostaglandin E<sub>2</sub>[J]. J Immunol, 2012, 188(1): 21.
- [9] Arthur Barrie, Anupriya Khare, Matthew Henkel, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> and IL-23 plus IL-1 $\beta$  differentially regulate the Th1/Th17 immune response of human CD161<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> memory T cells[J]. Clin Transl Sci, 2011, 4(4): 268.
- [10] 张威, 马贤德, 王健. 眼针对脑缺血再灌注模型大鼠COX-2, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ 表达影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(12): 2484.
- [11] Ye Seob Jee, Tae Jung Jang, Ki Hoon Jung. Prostaglandin E<sub>2</sub> and interleukin-1 $\beta$  reduce E-cadherin expression by enhancing snail expression in gastric cancer cells[J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(9): 987.

[责任编辑 李玉洁]

## Anti-angiogenesis Effects and Mechanism of Guizhi Fuling Wan on Endometriosis in a Rat Model

WAN Gui-ping<sup>1\*</sup>, ZHANG Zhen-zhen<sup>1</sup>, TANG Wei-wei<sup>1</sup>, GUI Tao<sup>1</sup>, ZHU Li<sup>1</sup>,  
MA Xiao-ping<sup>1</sup>, QIAN Ru-yun<sup>1</sup>, HU Chun-ping<sup>2</sup>, CAO Peng<sup>2\*</sup>

(1. Laboratory of Gynecological Oncology, the Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects and mechanism of Guizhi Fuling Wan on inhibiting angiogenesis in a rat model of endometriosis. **Method:** Rat endometriosis model was induced by autologous transplantation. The rats with endometriosis were divided into control group (negative control), low dose Guizhi Fuling Wan group ( $4.13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), high-dose Guizhi Fuling Wan group ( $8.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and gestrinone group (positive control,  $0.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). There was also a sham-operated group. After treatment for 28 days, the rats were killed by cervical dislocation. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and CD31 in ectopic endometrium was assessed by immunohistochemistry. The level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in peritoneal fluid (PF) was determined by ELISA. The mRNA expression of VEGF and hypoxia inducible factor-1 HIF-1 $\alpha$  in ectopic endometrium was evaluated by real-time PCR. **Result:** After treatment, Guizhi Fuling Wan could suppress the expression of PCNA and CD31 in ectopic endometrium, decline concentration of VEGF in PF ( $P < 0.05$ ), and reduce mRNA expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in ectopic endometrium ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Guizhi Fuling Wan significantly suppress angiogenesis in a rat endometriosis model, and the mechanism may be related to the inhibition expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$ .

**[Key words]** Guizhi Fuling Wan; endometriosis; angiogenesis; VEGF

子宫内膜异位症是指具有生长功能的子宫内膜组织异位到宫腔外的一种临床常见病、多发病,常引起盆腔痛、痛经、不孕等症状,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。虽然目前子宫内膜异位症的发病机制仍未阐明,但是国内外研究一致认为子宫内膜异位症的发生发展有赖于充足的血管生成和血液供应,抗血管生成治疗已经成为子宫内膜异位症治疗研究的新热点<sup>[2-3]</sup>。

桂枝茯苓丸出自《金匱要略》,是活血化瘀的名方,在临床上广泛应用于子宫内膜异位症等血瘀证的治疗,但是其作用的分子机制一直未被阐明。本研究从抑制血管生成的角度探讨桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症的治疗作用及作用机制。

### 1 材料

**1.1 药物与试剂** 桂枝茯苓丸由桂枝、茯苓、牡丹皮、赤芍、桃仁各 9 g 组成,由江苏省中西医结合医院中药房提供。药材加约 15 倍水浸泡 30 min,煎 2 次,每次大火煎开后小火煎 1 h,合并 2 次煎液至含生药  $0.83 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。孕三烯酮胶囊(北京紫竹药业有限公司,批号 53110111253)。水

合氯醛(国药集团化学试剂公司,批号 20120522),兔抗鼠血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 C2112),羊抗兔 IgG 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 C0512),兔抗鼠增殖细胞核抗原(PCNA)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 5),大鼠血管内皮生长因子(VEGF) ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 284506),TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 14105),RT-qPCR 第一链 cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo Scientific Fermentas 公司,批号 00091602),Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(美国 Thermo Scientific Fermentas 公司,批号 00093956),所有引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0, 1 000 mL:柠檬酸三钠 3 g,国药集团化学试剂有限公司,批号 20120228;柠檬酸 0.4 g,上海久德化学试剂有限公司,批号 206108)。**1.2 动物** 雌性、性成熟 SD 大鼠 40 只,体重 200 ~ 220 g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物许可证号 SCXK(沪)2007-0005,饲养于江苏省中医药研究院实验动物中心。饲养环境保持室温

20~25℃,相对湿度40%~60%,实验动物自由进食和饮水。

**1.3 仪器** BX41型显微镜(日本Olympus公司),电子天平(德国Sartorius公司),ABI 7500型实时定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

## 2 方法

**2.1 造模分组及给药** 50只大鼠,除留10只为假手术组外,其余大鼠按照胡春萍等<sup>[4]</sup>的方法建立大鼠子宫内膜异位症模型。将造模大鼠分为4组:模型对照组、桂枝茯苓丸低、高剂量组(4.13,8.26 g·kg<sup>-1</sup>)、孕三烯酮组(阳性对照,0.23 g·kg<sup>-1</sup>),每组10只。假手术组和模型对照组以等量双蒸水ig,桂枝茯苓丸ig,1次/d,孕三烯酮ig,2次/周,治疗28d。治疗结束后,将大鼠处死,摘取异位子宫内膜,假手术组摘取正常子宫内膜,立即将每个标本切为2份,分别用于免疫组化和实时定量PCR实验。

**2.2 内膜组织中PCNA和CD31的表达检测** 采用免疫组化法。内膜组织常规脱水、包埋、切片,厚度为3μm,接着进行脱蜡和水化。抗原修复:将1500~3000mL的柠檬酸盐缓冲液注入不锈钢压力锅中加热至沸腾。切片置金属架上,放入锅内,使切片位于液面以下,盖锅压阀。当压力锅开始喷气时,开始计时3min,停止加热,冷水冲至室温后,取出切片,蒸馏水洗后,PBS洗3min×3。10%正常山羊血清(PBS稀释)封闭,室温孵育10min,倾去血清,滴加一抗,4℃过夜,PBS洗3min×3。加适量生物素标记二抗,37℃孵育30min,PBS洗3min×3。每张切片滴加2滴新配的DAB显色液,显微镜观察3~10min,阳性显色即为标色。蒸馏水充分冲洗,苏木素轻度复染,0.1% HCl分化,自来水冲洗。乙醇、二甲苯逐级脱水,透明,树胶封片。

**2.3 腹腔液中VEGF的含量测定** 采用ELISA法。处死大鼠后,剪开腹膜,向腹腔内注射3mL生理盐水,轻轻摇动大鼠,利用生理盐水灌洗腹腔。收集灌洗液,4℃1500r·min<sup>-1</sup>离心10min,取上清液用于检测VEGF含量<sup>[5-7]</sup>。所有步骤按照说明书进行。

**2.4 内膜组织中VEGF和缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)mRNA的表达检测** 采用实时定量PCR法。

**2.4.1 RNA提取** 将内膜组织放入玻璃匀浆器,并加入1mL Trizol,研磨至匀浆。加入200μL三氯甲烷,剧烈振荡30s后静置5min,接着4℃,12000r·min<sup>-1</sup>离心10min。将上层水相小心转移至新的EP管中。加入等体积异丙醇,颠倒混匀后静置10min,然后4℃12000r·min<sup>-1</sup>离心15min,小心弃上

清。向沉淀中加入1mL用DEPC水现配的75%乙醇颠倒混合后,4℃10000r·min<sup>-1</sup>离心10min,弃上清。待沉淀自然干燥,加入60μL DEPC水溶解,-20℃冻存或逆转录。

**2.4.2 PCR检测** 根据RT-qPCR第一链cDNA合成试剂盒说明书,采用20μL反应体系,将2.4.1提取的RNA逆转录为cDNA,反应条件为:25℃10min,50℃15min,85℃5min。实时定量PCR按照Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix说明书进行。 $\beta$ -actin作为内参。反应条件为50℃2min,95℃10min,1个循环;95℃15s,60℃60s,40个循环。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	序列
VEGF	上游引物:5'-AGC AGA GGA AAG AGG TAG CAG G-3'
	下游引物:5'-CCC CAA AAG CAG GTC AGT CA-3'
HIF-1 $\alpha$	上游引物:5'-GAC ACC GCG GGC ACC GAT TC-3'
	下游引物:5'-TCG CCG AGA TCG TGC TGC AT-3'
$\beta$ -actin	上游引物:5'-CAC CCG CGA GTA CAA CCT TC-3'
	下游引物:5'-CCC ATA CCC ACC ATC ACA CC-3'

**2.5 数据统计分析** 采用SPSS 17.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对异位内膜PCNA表达的影响** 免疫组化检测异位内膜PCNA的表达以评价细胞增殖情况。模型对照组PCNA阳性细胞显著多于假手术组。桂枝茯苓丸和孕三烯酮治疗后,异位内膜PCNA阳性细胞明显少于模型对照组。见图1。

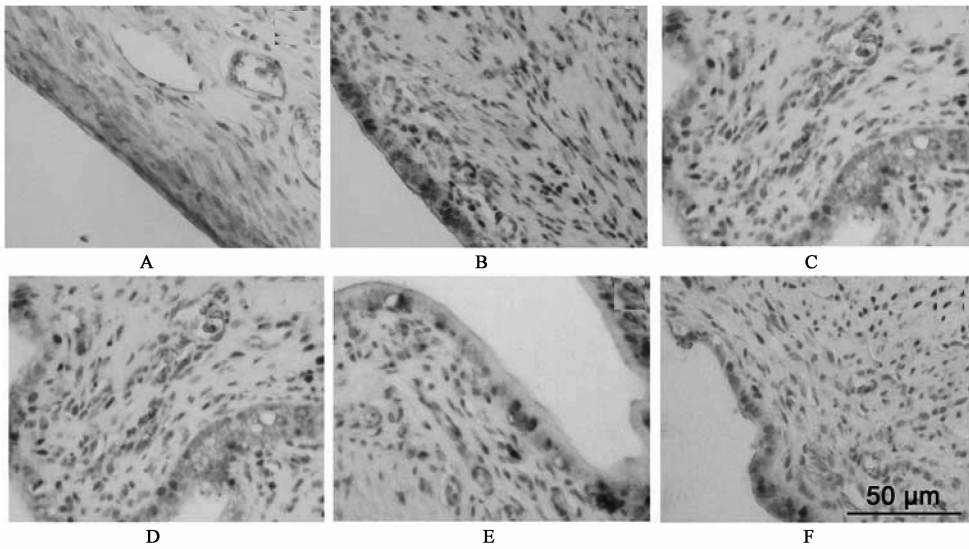
**3.2 对异位内膜CD31表达的影响** CD31阳性表达主要位于子宫内膜的血管内皮细胞。模型对照组中CD31阳性细胞显著多于假手术组。各实验组均可看到新生血管,而桂枝茯苓丸治疗组中血管数显著少于模型对照组。见图2。

**3.3 对腹腔液中VEGF水平的影响** 模型对照组大鼠腹腔液中VEGF水平明显高于假手术组,而桂枝茯苓丸治疗28d后,腹腔液中VEGF水平明显下降。见图3。

**3.4 对异位病灶中VEGF mRNA和HIF-1 $\alpha$  mRNA表达水平的影响** 桂枝茯苓丸可以显著下调异位内膜中VEGF和HIF-1 $\alpha$ 的mRNA水平。见图4~5。

## 4 讨论

在子宫内膜异位症的发生发展过程中,新生血



A. 假手术组; B. 模型对照组; C. 桂枝茯苓丸 4.13 g·kg<sup>-1</sup>组; D. 桂枝茯苓丸 8.26 g·kg<sup>-1</sup>组; E. 孕三烯酮 0.23 g·kg<sup>-1</sup>组 (图 2~5 同)

图 1 桂枝茯苓丸对异位内膜 PCNA 表达的影响

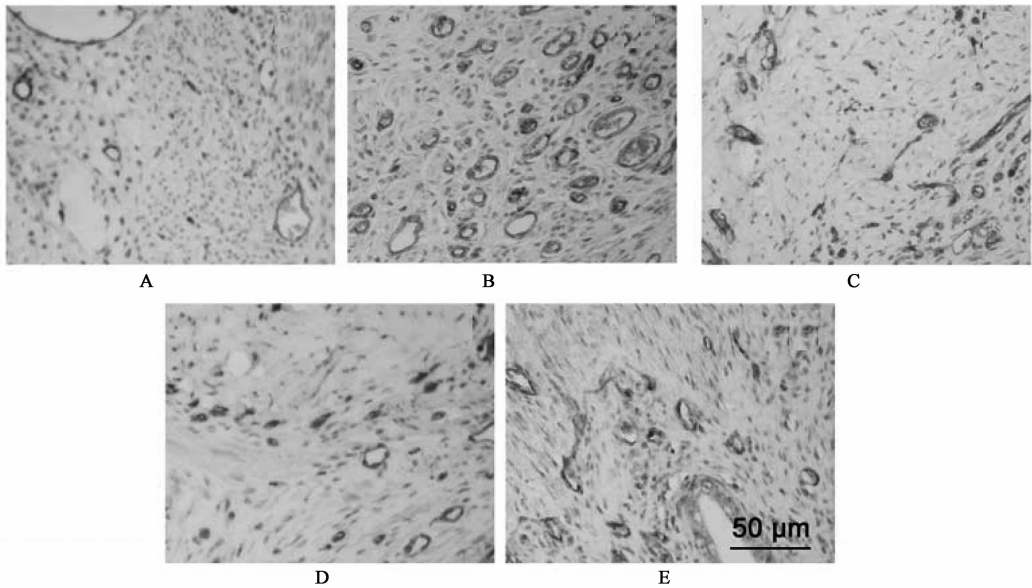
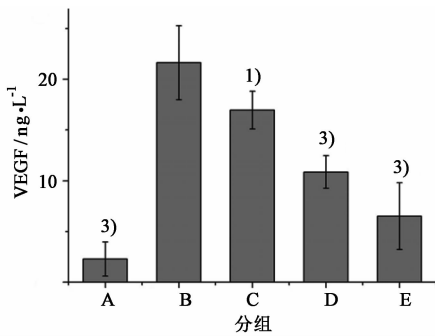


图 2 桂枝茯苓丸对异位内膜 CD31 表达的影响



与模型对照组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,  
<sup>3)</sup>  $P < 0.001$  (图 4~5 同)

图 3 桂枝茯苓丸对腹腔液 VEGF 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

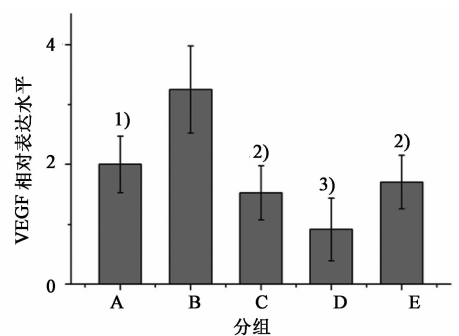


图 4 桂枝茯苓丸对异位内膜 VEGF 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

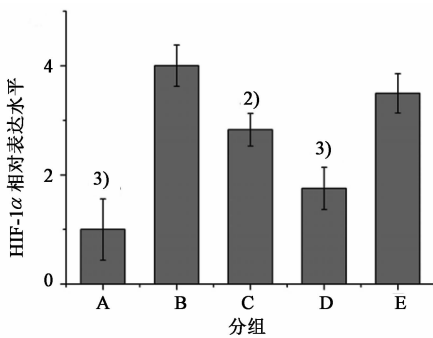


图5 桂枝茯苓丸对异位内膜 HIF-1α 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

管可以为异位病灶提供充足的氧气和营养物质,因此血管生成是异位病灶种植和增殖的必要条件<sup>[2]</sup>。

血管新生是一个多步骤的复杂过程,有多种细胞因子和生长因子参与调控,其中血管内皮生长因子(VEGF)是最为关键的刺激因子<sup>[6-7]</sup>。子宫内膜异位症患者腹腔液中 VEGF 的含量显著高于健康妇女<sup>[8]</sup>。而且,子宫内膜异位症的严重程度和患者腹腔液中分泌的 VEGF 的含量之间存在正相关性<sup>[9]</sup>。本实验中,子宫内膜异位症模型大鼠腹腔液中 VEGF 水平明显高于假手术组,经过桂枝茯苓丸 28 d 治疗之后,子宫内膜异位症大鼠腹腔液中 VEGF 水平明显下降。与之一致的是,桂枝茯苓丸治疗组大鼠异位病灶的血管密度显著低于模型对照组,且细胞增殖程度弱于模型对照组。接着,作者进一步检测了桂枝茯苓丸对 VEGF mRNA 水平的影响,发现桂枝茯苓丸可以在转录水平抑制 VEGF 的表达。

异位子宫内膜在异位种植的过程中必然经历一个缺氧的环境。在 HIF-1α (低氧诱导因子-1α)-VEGF 通路的调节下,低氧是极强的促血管生成因素<sup>[10]</sup>。在缺氧条件下,HIF-1α 与 VEGF 启动子的低氧反应元件结合,从而促进 VEGF 的表达<sup>[11]</sup>。桂枝茯苓丸明显下调异位病灶中 HIF-1α 的表达水平。

阳性对照孕三烯酮为临床上常用的治疗子宫内膜异位症的激素类药物,主要通过抗雌激素作用,抑制异位病灶的生长。实验结果显示,孕三烯酮和桂枝茯苓丸都可以明显降低异位内膜 PCNA 阳性的细胞数,降低异位内膜 VEGF 的表达及腹腔液中 VEGF 的水平。但是孕三烯酮不影响异位内膜中 HIF-1α 的表达。这些结果提示,桂枝茯苓丸和孕三烯酮通过不同的作用机制治疗子宫内膜异位症,桂枝茯苓丸可能是通过下调 HIF-1α 的表达,降低腹腔液和异位病灶中的 VEGF 水平,从而抑制异位病灶

的血管生成,抑制子宫内膜异位症的发展。桂枝茯苓丸也可能通过对雌激素和免疫系统的调节作用治疗子宫内膜异位症,作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis[J]. Hum Reprod, 2005,20(10):2698.

[2] Taylor H S, Osteen K G, Bruner-Tran K L, et al. Novel therapies targeting endometriosis[J]. Reprod Sci, 2011,18(9):814.

[3] Taylor R N, Mueller M D. Anti-angiogenic treatment of endometriosis;biochemical aspects[J]. Gynecol Obstet Invest, 2004,57(1):54.

[4] 胡春萍,胡婷婷,蔡雪婷,等.桂枝茯苓胶囊对子宫内膜异位症大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞数和 NK 细胞杀伤活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):145.

[5] Oktem M, Esinler I, Eroglu D, et al. High-dose atorvastatin causes regression of endometriotic implants: a rat model[J]. Hum Reprod, 2007,22(5):1474.

[6] Hoeben A, Landuyt B, Highley M S, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis [J]. Pharmacol Rev, 2004,56(4):549.

[7] Fasciani A, D'Ambrogio G, Bocci G, et al. High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata [J]. Mol Hum Reprod, 2000,6(1):50.

[8] Pupo-Nogueira A, de Oliveira R M, Petta C A, et al. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2007,99(1):33.

[9] Mahnke J L, Dawood M Y, Huang J C. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2000,73(1):166.

[10] Becker C M, Rohwer N, Funakoshi T, et al. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 {alpha} and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis [J]. Am J Pathol, 2008, 172(2):534.

[11] Greijer A E, van der Groep P, Kemming D, et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) [J]. J Pathol,2005,206(3):291.

[责任编辑 李玉洁]